

**Untersuchungen über die Motilität
von Bullenspermien,
insbesondere über den Einfluß ihrer Geschwindigkeit
auf das Befruchtungsvermögen**

Hans-Joachim Gschwend



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Lehrstuhl: Professor Dr. W. Leidl

und

dem Besamungsverein Neustadt a.d. Aisch e.V.

Leitender fachtechnischer Direktor: Dr. Rudolf Hahn

Untersuchungen über die Motilität von Bullenspermien,
insbesondere über den Einfluß ihrer Geschwindigkeit
auf das Befruchtungsvermögen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Hans-Joachim Gschwend

aus

Herrlingen

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Prof. Dr. Dr. F. Bakels

Tag der Promotion: 28. Februar 1986

Druck: Dissertationsdruck Novotny jr., 8135 Söcking/Starnberg

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	3
2.1. Eigenschaften von Bullenspermien und ihre Beziehungen zur Fertilität	3
2.1.1. Aussagekraft verschiedener Laboruntersuchungsverfahren für das Befruchtungsvermögen eines Ejakulates	5
2.1.2. Das Non-Return-Verfahren	7
2.2. Technik der Videomikrographie	8
2.2.1. Praktische Anwendung der Methode	8
2.2.2. "Stop Action Video"	9
2.2.3. Kombinierte Auswertung	10
2.2.4. Das Verfahren der "Multiple Exposure" Photographie	10
2.3. Messung und Auswertung mit Hilfe des Computers	11
2.3.1. Vergleich zweier Verfahren	12
Computer - herkömmliche Spermauntersuchungsmethoden	
3. MATERIAL UND METHODEN	14
3.1. Versuchsaufbau	14
3.1.1. Bullen	14
3.1.2. Spermagewinnung und Konservierung	14
3.1.3. Einsatz in der KB	14
3.2. Beurteilung der Spermienmotilität	17

	Seite
3.2.1.	Probenverarbeitung 17
3.2.2.	Schätzung des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien 18
3.2.3.	Manuelle Auswertung der Videoaufnahmen 18
3.2.4.	Computergesteuerte Videomikrographie 20
3.2.4.1.	Geräte 20
3.2.4.2.	Meßprinzip 20
3.2.4.3.	Parameter der computergesteuerten Auswertung 22
3.3.	Statistische Methoden 23
4.	ERGEBNISSE 25
4.1.	Non-Return Ergebnisse 25
4.2.	Meßergebnisse 27
4.2.1.	Manuelle Auswertung der Videomikrographie 27
4.2.2.	Computergesteuerte Auswertung der Videomikrographie 31
4.2.3.	Vergleich der Verfahren 38
4.2.3.1.	Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien nach Schätzung und nach Videomikrographie 38
4.2.3.2.	Vergleich der beiden videomikrographischen Verfahren 43
4.2.4.	Beziehungen zwischen dem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien sowie der Spermien- geschwindigkeit der Einzelejakulate und ihren Non-Return Raten 44

III

5.	DISKUSSION	53
6.	ZUSAMMENFASSUNG	63
7.	SUMMARY	66
8.	LITERATURVERZEICHNIS	68

1. EINLEITUNG

Hauptziel der spermatologischen Untersuchung im Rahmen der künstlichen Besamung (KB) ist es, das Befruchtungsvermögen eines Ejakulates möglichst genau vorherzusagen. Unter den Spermaeigenschaften, die für diesen Zweck verwendet werden, nimmt die Motilität der Spermien eine zentrale Stellung ein. Mit den in den vergangenen Jahren gebräuchlichen Methoden war es allerdings bisher nur möglich den Anteil beweglicher Spermien subjektiv zu erfassen. Geringgradige Unterschiede konnten bei Routineuntersuchungen nicht verifiziert werden. Dies wurde u.a. darauf zurückgeführt, daß Aussagen im Regelfall nur auf Schätzungen beruhten.

Seit einiger Zeit steht nun mit der sogenannten Videomikrographie ein Verfahren zur Verfügung, das eine objektive Bestimmung sowohl des Anteils aller beweglichen Samenzellen als auch der Geschwindigkeit der einzelnen Spermien erlaubt. Allerdings konnte sich diese Form der Videomikrographie, bei der eine manuelle Messung der Beweglichkeit erforderlich ist, wegen des großen Zeitaufwandes nicht durchsetzen. Deshalb wurde untersucht, ob eine computergesteuerte Auswertung zu brauchbaren Ergebnissen führt.

Ziel dieser Untersuchungen war es, Beziehungen zwischen der Vorwärtsbewegung und der Geschwindigkeit von Bullenspermien und dem Befruchtungsvermögen der entsprechenden Samenproben zu überprüfen.

fen. Zum Vergleich wurde die schon erwähnte manuelle Messung in Verbindung mit der Videomikrographie nach RIEMKE (1984) herangezogen.

2. LITERATUR

2.1. Eigenschaften von Bullenspermien und ihre Beziehungen zur Fertilität.

Die Beziehungen zwischen bestimmten Spermienparametern und der Fertilität sind vielfach untersucht worden. Ein wesentliches Ziel solcher Analysen war es, das Befruchtungsvermögen einzelner Ejakulate eines Bullen vorhersagen zu können. Während die errechneten Korrelationen zwischen einzelnen Spermaeigenschaften und der Fruchtbarkeit in den zahlreichen Arbeiten sehr unterschiedlich sind, gilt es als unumstritten, daß mehrere Parameter für die Beurteilung der Spermaqualität erforderlich sind, wobei einigen ganz besondere Bedeutung zukommt.

Schon GOETZE (1949) betonte, daß es kein einzelnes sicheres Kriterium für die Prognose des Befruchtungsvermögens von Samenzellen gibt. Nur aufgrund einer vollständigen grobsinnlichen und mikroskopischen Untersuchung, verbunden mit chemisch-physikalischen Merkmalen, kann man auf die Qualität eines Ejakulates schließen. Ejakulate mit großem Volumen, ausreichender Dichte und guter Bewegungsfähigkeit der Spermien sind im Hinblick auf das Befruchtungsvermögen immer günstiger zu beurteilen als mengenmäßig kleine Ejakulate, die eine geringe Dichte und eine herabgesetzte Spermienmotilität aufweisen.

Die Untersuchung verschiedener Spermienparameter und ihrer Beziehungen zur Fertilität hat ergeben, daß die Anzahl lebender Spermien und ihre Vorwärtsbeweglichkeit sowie ihre Kapazitationsfähigkeit enger mit der Fertilität korreliert sind als die metabolische Aktivität, wie sie in der Methylenblau-Reduktionsprobe oder dem Fructolyseabbau zum Ausdruck kommt. Darüberhinaus wirkt sich der Anteil toter Spermien in einem Ejakulat negativ auf die Fertilität aus (BISHOP 1953).

Nach VAN DUIJN jun. (1971) ist das potentielle Befruchtungsvermögen der Spermien primär von folgenden Eigenschaften abhängig:

1. Der Gesamtzahl der ejakulierten Spermatozoen.
2. Der mittleren Geschwindigkeit normal beweglicher Spermatozoen.
3. Dem Anteil der strukturell und funktionell normalen Spermatozoen.
4. Der Geschwindigkeit, mit der die Spermatozoen altern.

Diese zuletzt genannte Eigenschaft läßt sich nach VAN DUIJN (1971) am besten durch die Halbwertszeit der Migrationsgeschwindigkeit ermitteln. Darunter versteht er die Zeit, in der das Produkt der Anzahl normal beweglicher Spermatozoen und ihrer mittleren Geschwindigkeit auf die Hälfte abgesunken ist (= Migrationsgeschwindigkeit). Weiterhin stellte er fest, daß sowohl die Konzentration normal beweglicher Spermien als auch die Migrationsgeschwindigkeit, einschließlich ihrer Halbwertszeiten, zum Zeitpunkt der Ejakulation für das Einzeltier spezifisch sind.

SAACKE und WHITE (1972) führten Untersuchungen über einige Parameter der Samenqualität und ihrer Beziehung zur Fertilität durch. Dabei konzentrierten sie sich vor allem auf die Anzahl vorwärtsbeweglicher Spermien und die Akrosomenbeschaffenheit. Hier können Veränderungen, unter anderem durch den Alterungsprozeß der Spermien, aber auch durch Manipulation bei der Spermagewinnung, -konservierung und -konfektionierung auftreten. Unterschiede von Tier zu Tier spielen, nach Meinung der Autoren, beim Tiefgefrierprozeß des Spermas eine erhebliche Rolle. Sie korrelierten die Anzahl intakter Akrosomen von Spermien mehrerer Ejakulate und die Anzahl vorwärtsbeweglicher Spermien mit der 90 Tage Non-Return Rate. Dabei ergab sich für den Prozentsatz intakter Akrosomen eine positive Korrelation zur Fertilität ($r = 0,8$), für den der motilen Spermien eine Korrelation von ($r = 0,56$), so daß in diesem Experiment der Anteil von Spermien mit intakten Kopfkappen stärker zur Fertilität korreliert war als der vorwärtsbeweglicher Spermien.

2.1.1. Aussagekraft verschiedener Laboruntersuchungsverfahren für das Befruchtungsvermögen eines Ejakulates.

LINFORD und GLOVER (1976) befaßten sich mit dem Wert verschiedener Labortests, die häufig für die Beurteilung des potentiellen Befruchtungsvermögens einer Samenprobe herangezogen werden.

Folgende Verfahren wurden überprüft:

- a) Schätzung der vorwärtsbeweglichen Spermien einer Probe von 2 Untersuchern
- b) Verdünnung der Probe mit 0,9%iger NaCl-Lösung als Resistenztest.
- c) Ermittlung des Prozentsatzes der toten Spermien.
- d) Ermittlung des Prozentsatzes pathologisch geformter Spermien.
- e) Beurteilung der Motilität tiefgefroren konservierter Proben 24 Stunden nach dem Auftauen.
- f) Motilität der Spermien nach einstündiger bzw. zweistündiger Inkubation der Proben im Wasserbad bei +40°C.

Die mit diesen Beurteilungsmethoden an Sperma von Holstein Friesian-Bullen gewonnenen Ergebnisse wurden mit den 112 Tage Non-Return Raten von 160 Erstbesamungen pro Ejakulat verglichen. Kein Parameter, außer den morphologisch anomalen Spermien, erlaubte eine Vorhersage der Non-Return Rate mit 95 %iger Zuverlässigkeit. Der Prozentsatz der Spermienanomalien zeigte eine negative Beziehung zum Befruchtungsvermögen, mit einem Korrelationskoeffizienten zur Non-Return Rate von $r = -0.604$.

Auch PAPA et al. (1982) korrelierten die Non-Return Ergebnisse (57 Tage) mit dem Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien und der Akrosomenintegrität der Samenzellen. Ohne Vorliegen von signifikanten Unterschieden bei den Samenparametern traten jedoch signifikante Variationen der Non-Return Raten auf. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Befunden von SAACKE und WHITE (1972). Eine Ursache dieser Diskrepanz könnte sein, daß die

Differenzen der Non-Return Raten auch durch andere Faktoren zustande kommen.

Beobachtungen über die Migration von Spermien in Kapillaren mit Cervikalschleim von brünstigen Kühen ergaben, daß unterschiedlich schnelle Populationen von Spermien auftraten, die jedoch in ihren Bewegungscharakteristika identisch waren (KATZ et al. 1981). Der Unterschied bei der Wanderungsgeschwindigkeit der Spermien ist wahrscheinlich durch Veränderungen des Cervikalschleims bedingt. Eine bestimmte Beschaffenheit des Schleimes scheint den Penetrationsvorgang einiger Spermien zu beschleunigen.

2.1.2. Das Non-Return Verfahren.

Dieses Verfahren dient zur raschen Feststellung des Besamungserfolges von erstbesamten Rindern. Tiere, die innerhalb eines definierten Zeitraums, z.B. 30, 60 oder 90 Tage nach einer Erstbesamung nicht erneut zur Insemination vorgestellt werden, gelten als trächtig. Der Anteil dieser Kühe ist nicht gleichbedeutend mit dem Prozentsatz tatsächlich tragender Tiere (BUSCH 1982).

Alle Rinder, die beispielsweise während des definierten Zeitraums ausscheiden (Schlachtung etc.), gehen als trächtig in die Berechnung ein, unabhängig davon, ob sie nun tragend waren oder nicht.

Die Non-Return Rate ist für die künstliche Besamung beim Rind von überragender Bedeutung, weil rasch und ohne großen Aufwand die

Besamungsergebnisse der Betriebe und der Besamungsstationen sowie der Besamungsbeauftragten und Tierärzte erfaßt und verglichen werden können.

2.2. Technik der Videomikrographie.

KATZ und OVERSTREET (1981) stellten eine Meßanordnung zusammen, bei der das Videobild einer mikroskopischen Spermaaufnahme auf Monitor übertragen wird und mit Hilfe einer Zeitschaltvorrichtung gestoppt werden kann. Zur Beurteilung der Vorwärtsbewegung läuft das Bild 0,5 Sekunden. Alle Spermien, die sich innerhalb dieser Zeit deutlich von ihrem Markierungsort entfernen, werden als motil bezeichnet. Nach einer Laufzeit von 1 Sekunde kann durch Anlegen einer kalibrierten Meßscheibe an das Kopfende eines Spermiums dessen Geschwindigkeit pro Sekunde direkt vom Monitor abgelesen werden. Durch Bewerten verschiedener Gesichtsfelder einer Probe werden Durchschnittswerte gewonnen.

2.2.1. Praktische Anwendung der Methode.

RIEMKE (1984) überprüfte die von KATZ und OVERSTREET (1981) beschriebene Methode bei Bullen und untersuchte verschiedene Ejakulate von mehreren Tieren. Er registrierte die Vorwärtsbewegung und die Geschwindigkeit der Spermien. Besondere Aufmerksamkeit widmete er dem Einfluß der Temperatur. Darüberhinaus galt sein

Interesse den Auswirkungen der Verdünnung der Flüssig- und Tiefgefrierkonservierung sowie dem Einfluß pharmakologischer Substanzen wie Koffein, Kallikrein und Epinephrin.

Grundsätzlich wurde gezeigt, daß die Anwendung dieser Form der Videomikrographie zur Motilitätsbeurteilung von Bullenspermien geeignet ist. Des weiteren wurde festgestellt, daß die Temperatur in bestimmten Bereichen einen positiven Einfluß auf die Vorwärtsbewegung und Geschwindigkeit der Samenzellen hat. Die Verdünnung des Spermas für die Flüssigkonservierung bewirkte ein deutliches Absinken der Geschwindigkeit und des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien. Nach der Tiefgefrierkonservierung nahm der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Samenzellen deutlich, ihre Geschwindigkeit jedoch nur geringfügig ab. Die oben erwähnten pharmakologischen Substanzen führten bei den untersuchten Proben in jedem Fall zu einer Steigerung des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien wie auch zu einer Erhöhung ihrer Geschwindigkeit.

Als Nachteil dieser Technik wurde der erhebliche Zeitaufwand empfunden. Die Auswertung von 300 Spermien einer Probe nahm ca. 3 Stunden in Anspruch.

2.2.2. "Stop Action Video"

Bei dieser Methode werden ebenfalls verschiedene Gesichtsfelder einer Spermaprobe untersucht, wobei zunächst die Gesamtzahl der Spermien am gestoppten Bild und anschließend die Zahl der vor-

wärtsbeweglichen Spermien am langsam weiterlaufenden Bild erfaßt wird (WALL und BOONE 1973).

2.2.3. Kombinierte Auswertung.

JECHT und RUSSO (1973) kombinierten Videotechnik und Computer, indem sie Einzelbewegungen von Spermien auf Videoband aufnahmen, diese in Digitaldaten transformierten und durch den Computer auswerten ließen. Auf diese Weise konnten 10 Spermien pro Minute erfaßt werden.

2.2.4. Das Verfahren der "Multiple Exposure" Photographie.

Es beruht darauf, daß Spermaproben mit Hilfe eines Stroboskops mehrmals belichtet werden (MAKLER 1979, 1980a, MAKLER et al. 1979, MAKLER et al. 1980). Für die Auswertung muß die Aufnahme auf Papier projiziert und die zurückgelegte Strecke nachgemessen werden.

Durch Nachziehen der Linien, die die Spermien zurücklegten und anschließendes Nachziehen durch einen Computer-gekoppelten Digitalisierertisch ergab sich eine Verringerung des Arbeitsaufwandes bei der Auswertung der Proben.

2.3. Messung und Auswertung mit Hilfe des Computers.

In einem von LIU und WARME (1975) entwickelten Verfahren, werden Vorwärtsbewegung und Geschwindigkeit von Spermien durch ein computergesteuertes System bestimmt. Die Erkennung der Zellen erfolgt hier durch wiederholtes Abtasten und Vergleichen der Einzelbilder. Dabei werden Impulsveränderungen, hervorgerufen durch wechselnde Lichtintensität, ausgenutzt, so daß in jedem Punkt des Videobildes die obere Begrenzung einer Zelle als Abnahme und die untere Begrenzung als Zunahme der Impulse registriert wird. Diese Impulsveränderungen liegen in einem bestimmten Schwellenbereich, so daß eine Zelle, z.B. ein Spermium, über mehrere Bilder identifiziert und zugeordnet werden kann. Zur Bestimmung der Geschwindigkeit müssen die Spermien bei der in der Videotechnik üblichen Frequenz von 25 Bildern pro Sekunde verfolgt werden, um zu brauchbaren Werten zu kommen.

AMANN (1979) und AMANN und HAMMERSTADT (1980) machten über ein Phasenkontrastobjektiv Filmaufnahmen von einer Spermaprobe und belichteten jeweils 18 - 25/Sek. Die Bilder wurden auf eine Leinwand projiziert und von dort über eine Videokamera vom Computer erfaßt und auf Monitor übertragen. Jedes Bild enthielt ca. 20 - 45 Spermien. Der Computer identifizierte die Spermienköpfe und ordnete sie in 3 - 7 aufeinanderfolgenden Bildern den zugehörigen Spermien zu. Anschließend verglich er sie mit dem ersten Bild.

Das Computerprogramm lieferte Informationen über die Geschwindigkeit der Spermien, den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Samen-

zellen, die schneller als $35 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ waren und die Durchschnittsgeschwindigkeit dieser vorwärtsbeweglichen Spermien.

Bei einem geringen Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien waren die Werte ungenau. So wurden beispielsweise in einer Probe, die ausschließlich tote Spermien enthielt, 31 % als vorwärtsbeweglich eingestuft. Mit steigender Anzahl vorwärtsbeweglicher Spermien in einer Probe verbesserte sich auch die Genauigkeit der Auswertung. Das beschriebene System zur Beurteilung von Spermien eignet sich für Frischsperma mit einem hohen Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien (50 %). Für Ejakulate mit einem geringeren Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien eignen sich die herkömmlichen Methoden besser als die hier beschriebene Computerauswertung.

2.3.1. Vergleich zweier Verfahren: Computer - herkömmliche Spermauntersuchungsmethoden.

O'CONNOR et al. (1981) verglichen die Beurteilung der Motilität von Spermien mittels Computerbildanalyse einerseits und herkömmlichen Methoden andererseits. Weiterhin untersuchten sie, ob durch die computergesteuerte Analyse eine für die Praxis brauchbare Vorhersage des Befruchtungsvermögens möglich ist. Die Korrelation zwischen den mit dem Computer ermittelten Werten und den mit den üblichen Laboruntersuchungsmethoden erhaltenen Parametern variierte zwischen $r = 0.46$ und $r = 0.72$. Zwischen den Non-Re-

turn Raten und den Ergebnissen der Computerauswertung einerseits und den Resultaten der üblichen Spermauntersuchung andererseits bestanden keine signifikanten Beziehungen. Nach Meinung dieser Autoren bietet deshalb die Computerauswertung gegenwärtig keinen Vorteil gegenüber herkömmlichen Untersuchungstechniken.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsaufbau

3.1.1. Bullen

In die Untersuchung wurden 20 Bullen des Besamungsvereins Neustadt/Aisch einbezogen. Es handelte sich ausschließlich um Altbullen der Rasse "Deutsches Fleckvieh" im Alter zwischen 5 und 7 Jahren. Bei der Auswahl wurden Tiere mit möglichst unterschiedlicher Fruchtbarkeit (60 - 90 Tage Non-Return Raten) berücksichtigt (Tab. 1). Die Bullen waren gesund und wiesen keine Besonderheiten an den Geschlechtsorganen auf.

3.1.2. Spermagewinnung und -konservierung.

Von **jedem Bullen** wurden von den im Zeitraum zwischen November 1983 und Juni 1984 gewonnenen Ejakulaten je 2 Ejakulate herangezogen, die, wie an der Besamungsstation üblich, mit einem CUE-Tris Eidotterverdünner in Pailletten von 0,5 ml eingefroren wurden.

3.1.3. Einsatz in der KB.

Von jedem der 40 Ejakulate (2 pro Bulle), wurden 6 Pailletten zur Motilitätsbeurteilung abgezweigt. Für den Einsatz in der KB wur-

den an jeden von 20 Besamungsbeauftragten im Regierungsbezirk
Oberpfalz von jedem Ejakulat 4 Pailletten, d.h. 8 pro Bulle, al-
so insgesamt 160 Portionen ausgegeben.

Tab. 1: 60 -90 Tage Non-Return Raten (NRR) der für den Versuch ausgewählten Bullen, sowie Zeitpunkt der Gewinnung der Ejakulate (Angabe des Datums als ...ter Tag des betreffenden Jahres).

Bulle	NRR ¹ in %	Ejakulat I	Ejakulat II
1	71,1	138.84	159.84
2	69,6	082.84	094.84
3	67,7	132.84	160.84
4	71,3	328.83	333.83
5	69,0	079.84	095.84
6	60,0	131.84	157.84
7	65,1	073.84	094.84
8	65,5	068.84	143.84
9	63,5	130.84	137.84
10 ²	- -	158.84	165.84
11	72,9	079.84	095.84
12	63,2	080.84	103.84
13	53,4	132.84	160.84
14	56,6	041.84	062.84
15	71,6	095.84	107.84
16	69,4	129.84	136.84
17	64,1	128.84	149.84
18	60,7	087.84	094.84
19	68,7	079.84	100.84
20	67,4	061.84	108.84

1 Mittelwerte der Non-Return Raten in den Monaten 10, 11, 12/83, die für die Selektion der Bullen maßgeblich waren

2 Zum Zeitpunkt der Auswahl des Bullen lag noch kein Besamungsergebnis vor.

Im Zeitraum zwischen dem 01.10.84 und 31.10.84 setzte jeder Besamungsbeauftragte mindestens 5 Pailletten pro Bulle, also insgesamt 100 Portionen, für Erstbesamungen ein. Die restlichen 3 Pailletten standen als Ersatz für Ausfälle zur Verfügung. Insgesamt konnten die Ergebnisse von 2886 Erstbesamungen für die Ermittlung der Non-Return Raten ausgewertet werden.

3.2. Beurteilung der Spermienmotilität.

3.2.1. Probenverarbeitung.

Die für die Messungen vorgesehenen Pailletten wurden bei -196°C gelagert und einzeln für jede Messung entnommen. Das Auftauen erfolgte mit einem Auftaugerät (Minitüb) unmittelbar vor der Messung (15 Sekunden bei $+38^{\circ}\text{C}$).

Aus jeder Paillette wurde 1 Probe mit einer Pasteurpipette aufgesaugt und in die auf $+38^{\circ}\text{C}$ vorgewärmte Zählkammer nach Makler (MAKLER 1978, 1980b) verbracht. Unter dem Mikroskop erfolgte zuerst eine Überprüfung der Probe bei 200-facher Vergrößerung auf ihre Verwendbarkeit, anschließend wurden 10 verschiedene Gesichtsfelder (je 10 Sekunden lang) auf Videoband aufgenommen (RIEMKE 1984).

Während dieses Arbeitsvorganges lagerte die Paillette bei Zimmertemperatur. Nach Abschluß der Videoaufnahme wurde die Zählkammer

mit Aqua dest. gewaschen, getrocknet, wieder auf $+38^{\circ}\text{C}$ vorgewärmt, mit einer neuen Probe aus der gleichen Paillette beschickt und, wie oben, von verschiedenen Gesichtsfeldern 10-Sekunden Videoaufnahmen angefertigt.

3.2.2. Schätzung des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien.

Von den ausgewählten Ejakulaten wurden Pailletten mit identischem Produktionsdatum für die subjektive Schätzung der Vorwärtsbewegung der Spermien abgesondert. Diese Beurteilung fand an der Station statt, bevor die Ejakulate in den Besamungseinsatz gingen.

3.2.3. Manuelle Auswertung der Videoaufnahmen.

Für die Handmeßmethode (RIEMKE 1984) wurden in vorgenannter Weise pro Ejakulat 2 Pailletten mit jeweils 3 Proben verwendet. Von jeder Probe wurden 10 Gesichtsfelder auf Videoband aufgenommen, und anschließend die Spermengeschwindigkeit und der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien erfaßt.

Die Auswertung erfolgte direkt am Fernsehschirm. Nach Einstellen eines Standbildes des ersten Gesichtsfeldes einer Probe wurden die ersten 5 Spermien entlang einer V-förmigen Linie am Monitorschirm mit einem trocken abwaschbaren Filzstift im Bereich des Kopfes markiert. Nach Betätigung der Zeitschaltuhr lief das Band

0.5 Sekunden weiter und alle Spermien, die sich von ihrem Markierungsort entfernt hatten, wurden in das Versuchsprotokoll als motil eingetragen. Sofort im Anschluß daran wurde noch im gleichen Gesichtsfeld, wiederum von einem Standbild ausgehend, die Geschwindigkeitsmessung durchgeführt. Dazu wurde eine Klarsichtfolie verwendet, die konzentrische Kreise aufwies, deren Abstand im Verhältnis zur verwendeten Mikroskopvergrößerung kalibriert war. Diese Folie wurde auf den Bildschirm so aufgelegt, daß ihr Mittelpunkt auf dem Kopf eines Spermiums auf der V-förmigen Linie lag. Die Zeitschaltuhr, die nun auf 1 Sekunde Bandvorlauf eingestellt war, wurde betätigt, und die vom Spermium innerhalb dieser Zeit durchschwommene Strecke direkt von der Folie abgelesen. Auf diese Weise kamen pro Gesichtsfeld 5 Spermien zur Auswertung. Insgesamt wurden pro Ejakulat 300 Spermien zur Ermittlung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien sowie zur Geschwindigkeitsmessung herangezogen. Letztere konnte aus technischen Gründen nur dann durchgeführt werden, wenn es sich um geradlinig vorwärtsbewegliche Spermien handelte. Stellte sich heraus, daß ein zur Messung vorgesehenes Spermium bei der Bewegung des Standbildes für 1 Sekunde nicht motil war, mußte auf eine andere, subjektiv sichtbar vorwärtsbewegliche Samenzelle zurückgegriffen werden. Die Stufen der Geschwindigkeitsmessung betrugen $5 \mu\text{m}/\text{Sekunde}$. Spermien, die weniger als $35 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ zurücklegten, wurden wegen der damit verbundenen Ungenauigkeit der Messung als nicht vorwärtsbeweglich eingestuft.

3.2.4. Computergesteuerte Videomikrographie.

3.2.4.1. Geräte:

- Monitor (RCA) mit 22,5 cm Diagonaldurchmesser des Bildschirms
- Videorecorder (Panasonic AG - 6200) mit einer VHS-Kassette (180 Min)
- Drucker (Epson FX-80)
- Microprocessor Bild Analyse Computer B - CAS 8810
- Mikroskop (Nikon Typ 115) mit dem Objektiv S Plan PL 20
- Heiztisch (Minitüb HT 100)
- Schwarzweißkamera (TV-Kamera RCA)
- Auftaucherät (Minitüb) eingestellt auf +38° C Auftautemperatur und 15 Sekunden Auftaudauer.
- Zählkammer (10 µm tief, Firma Sefi-Medical Instruments, Zählkammer nach Makler (siehe MAKLER 1978, 1980b)

3.2.4.2. Meßprinzip

Zur Computerauswertung wurden Videoaufnahmen von Spermien bei 200-facher Vergrößerung und bei +38° C, also in analoger Weise wie für die Handmessung verwendet. Das Prinzip beruhte auf der Rasterung des Fernsehbildes in Punkte (= Pixel). Bei 200-facher Vergrößerung entsprach 1 Pixel = 1.163 µm des untersuchten Objekts. Mit dem hier verwendeten System konnten Wegstrecken in

Stufen von 10 Pixels ($11.63 \mu\text{m}$) erfaßt werden. Das Fernsehbild bestand aus 256 Linien, die horizontal in jeweils 256 Bildpunkte (= Pixel) aufgeteilt (insgesamt also 65 536 Bildpunkten) waren. Auf Grund der Kapazität des Computers konnten 8 verschiedene Fernsehbilder gespeichert werden. Die Erkennung der einzelnen Spermienköpfe beruhte auf der dunkleren Farbe gegenüber dem Hintergrund, einer sogenannten höheren Grauwertstufe.

Um Verwechslungen mit anderen Partikeln in der Spermaprobe zu vermeiden, wurde die für die Erkennung notwendige Fläche der Mindestkopfgröße vorgegeben. Für diese Arbeit wurde eine mittlere Kopfgröße eines Bullenspermiums von $38.9 \mu\text{m}^2$ zugrunde gelegt (ORTAVANT 1959). Weiterhin konnte ein Mindestkopfabstand zwischen 2 Spermien gewählt werden, um Überschneidungen von benachbarten Samenzellen zu vermeiden. Nach der Festlegung der wählbaren Parameter konnte eine Auswertung erfolgen. Hierbei wurden alle Spermienköpfe erst in einem Bild, dann nach und nach in 7 weiteren Bildern, die während des Bandablaufs innerhalb 1 Sekunde gespeichert worden waren, vom Computer markiert und verglichen. Der Schwerpunkt der erkannten Spermienkopffläche galt hierbei als Bezugspunkt für die Entfernung des Spermienkopfes von einem Bild zum anderen. Jedes Gesichtsfeld wurde einzeln durch Programmablauf vollautomatisch ausgewertet.

3.2.4.3. Parameter der computergesteuerten Auswertung.

Die Meßergebnisse wurden ausgedruckt. Das Programm teilte die Spermien in verschiedene Bewegungsklassen ein. Spermien mit einer Geschwindigkeit zwischen 0 und ≤ 10 Pixels/Sek. ($\leq 11.6 \mu\text{m/Sek.}$) galten als unbeweglich. Spermien > 10 und ≤ 30 Pixels/Sek. ($> 11.6 - \leq 35 \mu\text{m/Sek.}$) wurden als ortsbeweglich, und diejenigen mit einer Geschwindigkeit > 30 Pixels/Sek. ($> 35 \mu\text{m/Sek.}$) als vorwärtsbeweglich eingeordnet.

Wenn der Abstand zwischen den Köpfen (Abb. 1: a) von einer fiktiven Geraden, die durch die Verbindung identischer Samenzellen im ersten und letzten (8.) Bild um mehr als 20 % kürzer als die tatsächliche Wegstrecke war, wurde die Bewegungsform nicht mehr als geradlinig eingestuft sondern unter der Bezeichnung Kreisläufer und sonstige unphysiologische Bewegungsformen registriert. Die restlichen Spermien wurden in der Rubrik "geradlinig" aufgeführt.

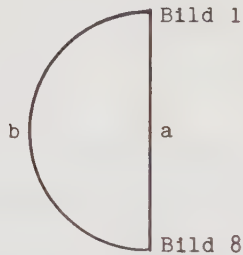
Die vorgenannten Parameter lieferten die Anzahl und den Prozentsatz der Spermien in der jeweiligen Bewegungsklasse sowie die Durchschnittsgeschwindigkeit jeder Gruppe. Darüberhinaus konnte noch die Geschwindigkeitsverteilung der vorwärtsbeweglichen Spermien abgelesen werden. Die Zahl der in einem Ejakulat mit diesem

Programm messbaren Spermien war variabel. Sie hing von der Anzahl der Spermien in einem bzw. 7 Folgebildern und ihrer über die Graustufen und Kopfform möglichen Identifizierung ab. Es waren mindestens 342, maximal 817 Spermien in einem Ejakulat bewertbar.

3.3. Statistische Methoden.

Für den Vergleich zwischen verschiedenen Parametern bzw. Meßmethoden wurden der t-Test sowie die Berechnung von Korrelationen und Regressionen herangezogen (WEBER 1972). Linearität und Signifikanz der Regressionsgeraden wurden überprüft, die statistische Absicherung der ermittelten Prozentwerte erfolgte über die inverse Sinustransformation.

Abb. 1: Computergesteuerte Auswertung der Videomikrographie:
Graphische Darstellung zur Definition der geradlinigen
Bewegung.



- a = geradlinig zurückgelegte Wegstrecke
b = tatsächlich durchschwommene Wegstrecke
 $a/b \times 100$ = Bahnparameter in %
 $a/b \times 100 \approx 80\%$ = geradlinige Bewegung
 $a/b \times 100 < 80\%$ = nicht geradlinige Bewegung, Kreisläufer
und unphysiologische Bewegungen.
-

4. ERGEBNISSE

4.1. Non-Return Ergebnisse.

Insgesamt konnten 2886 Erstbesamungsergebnisse von den 40 Ejakulaten zur Berechnung der Non-Return Raten verwendet werden. Sie betrugen 50.0 bis 79.7 %. Zwischen den beiden Einzelejakulaten, die im Versuchszeitraum pro Bulle gewonnen und ausgewertet wurden, bestanden zum Teil erhebliche Unterschiede in den Non-Return Raten. Der Bulle 10 wies mit 10.8 % die größte Differenz, der Bulle 12 mit 1.5 % die geringste Differenz auf (Tab. 2). Insgesamt gesehen war jedoch zwischen den Non-Return Raten aller "ersten" und "zweiten" Ejakulate kein signifikanter Unterschied nachzuweisen, so daß diese Werte zusammengefaßt werden konnten.

Die so ermittelte durchschnittliche Non-Return Rate von 63.1 % lag nur unwesentlich unter dem Durchschnittswert, der 1 Jahr zuvor erzielt wurde (65.9 %) und für die Auswahl der Bullen maßgeblich war. In Einzelfällen war die Differenz allerdings erheblich größer, beim Bullen 11 betrug sie beispielsweise 13.8 % (Tab. 2).

Tab. 2: Besamungsergebnisse der 20 Bullen, (60 - 90 Tage Non-Return Rate; NRR) vor und während des Versuchs.

Bulle	vor dem Versuch	während des Versuchs		
	NRR in %	insgesamt	Ejakulat 1	Ejakulat 2
1	71.1	70.1	71.4	68.9
2	69.6	65.3	62.5	68.1
3	67.7	65.3	69.6	60.0
4	71.3	75.5	79.7	72.6
5	69.1	67.8	70.0	65.8
6	60.3	58.9	63.5	53.5
7	65.2	57.2	60.3	54.4
8	65.5	62.2	63.4	61.1
9	63.5	61.5	60.0	63.2
10	---- ¹	59.3	64.8	54.0
11	73.0	59.2	57.7	60.6
12	63.2	65.0	64.3	65.8
13	53.5	57.0	62.2	51.5
14	56.6	65.0	63.4	66.7
15	71.6	68.9	65.8	72.0
16	69.6	72.4	75.3	69.4
17	64.2	52.1	50.0	54.3
18	60.7	55.8	54.1	57.5
19	68.7	66.2	69.4	62.7
20	67.5	58.2	53.3	62.3

$\bar{x} \pm s$ 65.9 ± 5.3 63.1 ± 6.0 64.0 ± 7.3 62.2 ± 6.5

Differenzen der Mittelwerte nicht signifikant ($P > 0.05$)

¹ Zum Zeitpunkt der Auswahl des Bullen lag noch kein Besamungsergebnis vor.

4.2. Meßergebnisse

Die beiden unterschiedlichen Meßmethoden machten eine getrennte Erstellung und Auswertung der in Abschnitt 3.2. genannten Videoaufnahmen notwendig.

4.2.1. Manuelle Auswertung der Videomikrographie.

Die Durchschnittsgeschwindigkeit aller in 40 Ejakulaten beurteilten Spermien mit einer Mindestgeschwindigkeit von $35 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ betrug $84.6 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ ("Erstejakulat", $n = 6000$) bzw. $81.8 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ "Zweitejakulat", $n = 6000$; Tab. 3). Daraus ergibt sich ein Gesamtdurchschnitt von $83.2 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ Der errechnete Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien war 58.2% in der Ejakulatreihe 1 und 55.6% in der Ejakulatreihe 2. Somit ergab sich ein Gesamtdurchschnitt aus 40 Ejakulaten von 56.9% .

Der höchste bzw. niedrigste Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien wurde im Ejakulat 1 des Bullen 4 (73%) bzw. im Ejakulat 1 des Bullen 6 (36%) ermittelt (Tab. 4). In den gleichen Ejakulaten wurde auch die höchste bzw. niedrigste Durchschnittsgeschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien gemessen ($93.6 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ bzw. $69.6 \mu\text{m}/\text{Sek.}$).

Faßt man alle Bullen zusammen, so bestand zwischen den Mittelwerten der beiden Ejakulate (Ejakulat 1 / Ejakulat 2) kein signifikanter Unterschied, weder für den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien noch für die Spermiengeschwindigkeit (Tab. 4).

Tab. 3: Vergleich der manuellen und computergesteuerten Auswertung der Videomikrographie am Beispiel von Durchschnittswerten aus 40 Samenproben (jeweils 2 Ejakulate von 20 Bullen).

Auswertung der Video- mikrographie	Prozentsatz vorwärtsbe- weglicher Spermien* $\bar{x} \pm s$	Geschwindigkeit aller vorwärts- beweglichen Spermien* $\bar{x} \pm s$	Geschwindigkeit geradlinig vor- wärtsbeweglicher Spermien $\bar{x} \pm s$
manuell	56.9 $\pm$ 9.6 ^a	nicht erfaßt	83.2 $\pm$ 6.3 ^c
computer- gesteuert	56.1 $\pm$ 10.2 ^b	74.0 $\pm$ 4.7 ^e	81.5 $\pm$ 6.1 ^d

Differenz a-b nicht signifikant ($P > 0.05$; t-Test)

Differenz c-d nicht signifikant ($P > 0.05$; t-Test)

Differenz e-d signifikant ($P \leq 0.01$; t-Test)

* Spermien mit einer Geschwindigkeit von $> 35 \mu\text{m}/\text{Sek.}$

Tab. 4: Manuelle Auswertung der Videomikrographie: Durchschnittswerte für den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien (% VB) und die Spermengeschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{Sek.}$)* in jeweils 2 Samenproben von 20 Bullen. Pro Ejakulat wurden 6 Proben à 10 Gesichtsfelder mit insgesamt 300 Spermien ausgewertet.

Bulle	Ejakulat 1		Ejakulat 2	
	% VB $\bar{x} \pm s$	$\mu\text{m}/\text{Sek.}$ $\bar{x} \pm s$	% VB $\bar{x} \pm s$	$\mu\text{m}/\text{Sek.}$ $\bar{x} \pm s$
1	59 $\pm$ 15.1	90.6 $\pm$ 22.4	54 $\pm$ 17.8	81.6 $\pm$ 13.9
2	70 $\pm$ 20.4	89.2 $\pm$ 15.0	65 $\pm$ 17.8	81.3 $\pm$ 13.4
3	62 $\pm$ 23.8	84.3 $\pm$ 16.1	49 $\pm$ 21.0	84.5 $\pm$ 15.4
4	73 $\pm$ 22.6	93.6 $\pm$ 17.4	69 $\pm$ 15.4	84.8 $\pm$ 15.0
5	67 $\pm$ 22.2	79.6 $\pm$ 13.7	64 $\pm$ 18.4	82.9 $\pm$ 14.7
6	36 $\pm$ 21.6	69.6 $\pm$ 12.2	36 $\pm$ 19.0	70.8 $\pm$ 11.4
7	58 $\pm$ 19.8	82.4 $\pm$ 14.9	53 $\pm$ 17.2	83.9 $\pm$ 15.4
8	65 $\pm$ 26.2	80.6 $\pm$ 12.5	63 $\pm$ 20.8	82.0 $\pm$ 14.0
9	49 $\pm$ 24.0	87.9 $\pm$ 14.8	57 $\pm$ 18.8	79.0 $\pm$ 14.9
10	62 $\pm$ 24.6	90.8 $\pm$ 15.8	56 $\pm$ 23.8	83.1 $\pm$ 15.8
11	46 $\pm$ 20.2	76.8 $\pm$ 14.5	62 $\pm$ 23.2	83.6 $\pm$ 15.7
12	58 $\pm$ 24.2	97.0 $\pm$ 12.6	37 $\pm$ 20.8	70.0 $\pm$ 11.2
13	57 $\pm$ 24.6	90.6 $\pm$ 14.1	50 $\pm$ 21.8	89.0 $\pm$ 16.6
14	58 $\pm$ 18.8	81.1 $\pm$ 15.2	58 $\pm$ 22.0	83.1 $\pm$ 16.2
15	69 $\pm$ 21.0	77.5 $\pm$ 13.3	63 $\pm$ 26.2	77.7 $\pm$ 13.4
16	70 $\pm$ 16.2	80.1 $\pm$ 13.4	61 $\pm$ 23.2	84.1 $\pm$ 14.4
17	59 $\pm$ 23.2	77.4 $\pm$ 15.1	61 $\pm$ 22.4	83.1 $\pm$ 14.1
18	46 $\pm$ 25.6	86.9 $\pm$ 14.1	55 $\pm$ 22.6	91.4 $\pm$ 16.0
19	58 $\pm$ 23.4	97.4 $\pm$ 14.3	57 $\pm$ 20.2	85.2 $\pm$ 16.2
20	41 $\pm$ 20.8	79.4 $\pm$ 13.7	42 $\pm$ 23.0	76.6 $\pm$ 14.6
$\bar{x} \pm s$	58.2 $\pm$ 10.1	84.6 $\pm$ 7.4	55.6 $\pm$ 9.1	81.8 $\pm$ 5.1

Diff. zwischen Mittelwerten der Ejakulate 1 und 2 $P > 0.05$ (t-Test). * Durchschnittswert der geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien mit einer Geschwindigkeit von $> 35 \mu\text{m}/\text{Sek.}$

Zwischen dem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien und deren Geschwindigkeit ergab sich eine lineare Regression ($y = 67.06 + 0.28 x$; $P \leq 0.01$; Abb 2). Mit der Zunahme des Anteils motiler Spermien war eine Steigerung der Geschwindigkeit zu beobachten.

4.2.2. Computergesteuerte Auswertung der Videomikrographie.

Die Messung der Spermengeschwindigkeit durch den Computer erlaubte eine Differenzierung der Spermien in unbeweglich, ortsbeweglich und vorwärtsbeweglich mit den Untergruppen "geradlinig" bzw. "nicht geradlinig"

Der durchschnittliche Anteil unbeweglicher Spermien, berechnet aus jeweils 20 Erst- und Zweitejakulaten von 20 Bullen betrug 29.7 % (Tab. 5), bzw. 27.9 % (Tab. 6).

Wesentlich geringer war der Anteil der als ortsbeweglich klassifizierten Spermien mit 15,6 % (Ejakulat 1) bzw. 14.6 % (Ejakulat 2; Tab. 5, 6). Zwischen den erwähnten Durchschnittswerten der "Ejakulate 1" und "Ejakulate 2" bestanden keine signifikanten Differenzen ($P > 0.05$). Dies gilt auch für die Klasse der vorwärtsbeweglichen Spermien mit Durchschnittswerten von 54.7 (Ejakulat 1; Tab. 5) bzw. 57.5 % (Ejakulat 2; Tab. 6).

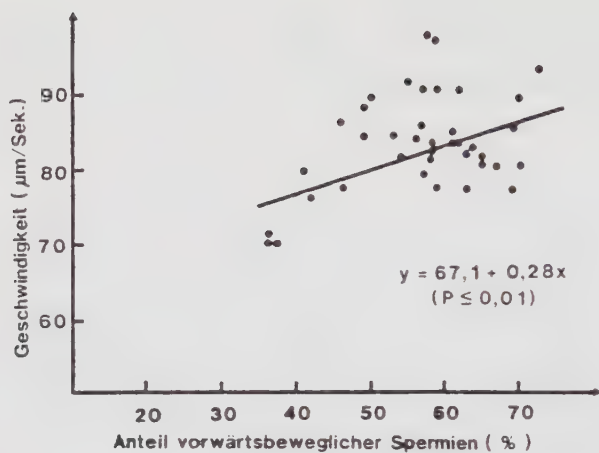


Abb. 2: Manuelle Auswertung der Videomikrographie -
Beziehung zwischen dem Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien und
der Spermengeschwindigkeit (40 Wertepaare von 20 Bullen à 2 Eja-
kulate).

Tab. 5: Computergesteuerte Auswertung der Spermienmotilität mit der Videomikrographie - Verteilung innerhalb der Bewegungsklassen im Ejakulat 1 von 20 Bullen.

Bulle	unbewegliche Spermien (%)	ortsbewegliche Spermien (%)	vorwärtsbewegliche Spermien (%)	
			geradlinig	insgesamt
1	26.1	14.5	34.5	59.4
2	22.3	12.0	40.9	65.7
3	36.9	13.9	33.4	49.2
4	35.4	15.0	28.5	49.6
5	20.1	18.0	36.1	61.9
6	39.6	17.0	26.6	43.4
7	21.9	13.5	32.1	64.6
8	30.2	12.7	33.5	57.1
9	28.9	16.7	26.0	54.4
10	37.0	16.6	23.7	46.4
11	35.9	16.7	26.7	47.4
12	27.6	16.2	26.8	56.1
13	30.9	13.2	39.1	55.9
14	33.2	20.8	23.3	46.0
15	15.1	12.8	44.0	72.2
16	28.0	14.2	37.7	57.7
17	18.5	14.2	33.2	67.3
18	41.0	16.0	22.1	43.0
19	35.5	21.8	30.5	42.7
20	29.7	15.9	28.8	54.4

$\bar{x} \pm s$ 29.7 $\pm$ 7.3 15.6 $\pm$ 2.6 31.4 $\pm$ 6.1 54.7 $\pm$ 8.7

Differenzen der Mittelwerte (Ejakulat 1 und 2) der jeweiligen Bewegungsklasse nicht signifikant ($P > 0.05$; t-Test)

Tab. 6 Computergesteuerte Auswertung der Spermienmotilität mit der Videomikrographie - Verteilung innerhalb der Bewegungsklassen im Ejakulat 2 von 20 Bullen.

Bulle	unbewegliche Spermien (%)	ortsbewegliche Spermien (%)	vorwärtsbewegliche Spermien (%)	
			geradlinig	insgesamt
1	12.6	10.1	56.3	77.3
2	14.7	14.4	43.1	70.9
3	35.3	21.1	26.7	43.3
4	32.6	12.3	28.5	55.1
5	13.2	10.9	44.4	75.9
6	44.2	16.3	23.5	39.5
7	22.9	14.1	32.7	63.0
8	42.9	12.3	26.6	44.8
9	31.5	11.4	27.4	57.1
10	24.4	13.9	30.4	61.7
11	17.4	17.1	34.0	65.5
12	41.6	19.8	23.6	38.6
13	26.0	16.1	39.0	57.9
14	30.5	14.6	30.1	54.9
15	23.5	7.8	33.2	68.7
16	20.9	12.0	39.5	67.1
17	33.2	17.1	25.8	49.7
18	25.6	13.9	27.7	60.5
19	29.6	17.6	33.4	52.8
20	36.8	18.7	15.8	44.5

$\bar{x} \pm s$ 27.9 ± 9.6 14.6 ± 3.4 32.1 ± 9.0 57.5 ± 11.6

Differenzen der Mittelwerte (Ejakulat 1 und 2) der jeweiligen Bewegungsklasse nicht signifikant ($P > 0.05$; t-Test)

Der Anteil geradlinig vorwärtsbeweglicher Spermien, im Sinne der in 3.2.4.3. aufgeführten Einteilung, betrug dagegen nur 31.4 % (Ejakulat 1; Tab. 5) bzw. 32.1 % (Ejakulat 2; Tab. 6). Zwischen den Proben der einzelnen Bullen bestanden allerdings z.T. deutliche Unterschiede, und zwar in allen Bewegungsklassen (Tab. 5, 6).

Wie bei den Ergebnissen der einzelnen Bewegungsklassen konnten auch bei der Analyse der Spermengeschwindigkeit zwischen den Durchschnittswerten der beiden Gruppen (Ejakulat 1 / Ejakulat 2) keine statistisch signifikanten Differenzen festgestellt werden (Tab. 7, 8). Die Werte aus den beiden Gruppen wurden daher zu einem Gesamtwert zusammengefaßt (siehe Tab. 3).

Die Durchschnittsgeschwindigkeit aller vorwärtsbeweglichen Spermien (geradlinig und nicht geradlinig, $v > 35 \mu\text{m}/\text{Sek.}$) betrug $74.0 \pm 4.7 \mu\text{m}/\text{Sek.}$, die der geradlinig vorwärtsbeweglichen war mit $81.5 \pm 6.1 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ erheblich höher. Die Differenz der Durchschnittswerte war statistisch signifikant ($P \leq 0.01$; Tab. 3).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der manuellen Auswertung konnte bei der Computerauswertung keine signifikante Regression zwischen dem Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermien und ihrer Geschwindigkeit ermittelt werden, unabhängig davon, ob alle vorwärtsbeweglichen (geradlinig und nicht geradlinig) oder nur die geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien in die Berechnung mit eingingen.

Tab. 7: Computergesteuerte Auswertung der Videomikrographie.
Durchschnittswerte für die Geschwindigkeit der geradlinig
vorwärtsbeweglichen Spermien (>35 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$) in $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ in
jeweils 2 Samenproben von 20 Bullen.

Bulle	Ejakulat 1		Ejakulat 2	
	Spermien n	$\mu\text{m}/\text{Sek.}$ $\bar{x} \pm s$	Spermien n	$\mu\text{m}/\text{Sek.}$ $\bar{x} \pm s$
1	214	85.1 $\pm$ 20.9	307	87.3 $\pm$ 20.2
2	174	87.2 $\pm$ 17.3	191	82.3 $\pm$ 19.8
3	170	97.7 $\pm$ 19.6	147	76.0 $\pm$ 17.2
4	104	83.1 $\pm$ 18.2	180	82.5 $\pm$ 17.7
5	256	73.5 $\pm$ 20.8	216	74.9 $\pm$ 17.8
6	87	78.9 $\pm$ 21.9	63	73.2 $\pm$ 19.0
7	188	86.8 $\pm$ 23.8	172	89.3 $\pm$ 21.5
8	138	84.2 $\pm$ 18.7	97	83.0 $\pm$ 22.3
9	99	80.1 $\pm$ 22.1	83	77.8 $\pm$ 18.3
10	93	84.4 $\pm$ 22.3	123	94.1 $\pm$ 20.6
11	137	79.3 $\pm$ 22.3	244	73.5 $\pm$ 22.6
12	146	75.8 $\pm$ 19.8	70	75.0 $\pm$ 20.4
13	232	88.3 $\pm$ 21.1	175	86.6 $\pm$ 20.2
14	150	77.6 $\pm$ 22.6	177	85.0 $\pm$ 22.0
15	252	73.9 $\pm$ 20.1	116	83.5 $\pm$ 18.8
16	158	80.4 $\pm$ 21.6	161	77.4 $\pm$ 20.2
17	117	83.6 $\pm$ 25.1	146	81.0 $\pm$ 21.0
18	91	89.3 $\pm$ 23.9	178	86.5 $\pm$ 19.4
19	118	76.8 $\pm$ 21.3	247	81.4 $\pm$ 18.5
20	144	71.6 $\pm$ 22.7	77	75.2 $\pm$ 21.7
$\bar{x} \pm s$	3068	81.8 $\pm$ 6.4	3170	81.2 $\pm$ 5.8

Differenzen der Mittelwerte (Ejakulat 1 und 2) nicht signifikant
($P > 0.05$; t-Test)

Tab. 8: Computergesteuerte Auswertung der Videomikrographie. Durchschnittswerte für die Geschwindigkeit aller-vorwärts-beweglicher Spermien (>35 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$) in $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ in jeweils 2 Samenproben von 20 Bullen.

Bulle	Ejakulat 1		Ejakulat 2	
	Spermien n	$\mu\text{m}/\text{Sek.}$ $\bar{x} \pm s$	Spermien n	$\mu\text{m}/\text{Sek.}$ $\bar{x} \pm s$
1	405	77.1 $\pm$ 21.4	435	82.5 $\pm$ 21.8
2	307	78.6 $\pm$ 20.7	339	75.1 $\pm$ 20.2
3	268	74.9 $\pm$ 20.8	264	69.1 $\pm$ 19.5
4	202	76.4 $\pm$ 20.5	287	76.3 $\pm$ 19.3
5	468	67.2 $\pm$ 20.0	390	69.5 $\pm$ 19.9
6	158	72.9 $\pm$ 22.2	135	65.6 $\pm$ 17.8
7	413	76.5 $\pm$ 23.7	353	80.1 $\pm$ 23.5
8	261	76.8 $\pm$ 20.8	187	75.2 $\pm$ 21.2
9	228	75.8 $\pm$ 24.9	196	72.1 $\pm$ 18.5
10	213	77.1 $\pm$ 22.2	270	81.8 $\pm$ 23.8
11	298	69.9 $\pm$ 22.9	516	66.6 $\pm$ 21.8
12	339	68.9 $\pm$ 19.5	142	70.7 $\pm$ 20.8
13	356	82.4 $\pm$ 23.5	276	78.1 $\pm$ 22.1
14	342	71.3 $\pm$ 21.6	361	76.0 $\pm$ 22.5
15	441	69.5 $\pm$ 19.5	255	78.1 $\pm$ 20.2
16	280	75.1 $\pm$ 22.7	296	71.9 $\pm$ 21.4
17	255	75.2 $\pm$ 23.6	314	72.5 $\pm$ 21.7
18	232	78.5 $\pm$ 22.3	409	76.1 $\pm$ 20.8
19	196	72.7 $\pm$ 22.6	431	74.5 $\pm$ 20.0
20	311	65.7 $\pm$ 21.7	254	64.2 $\pm$ 19.8
$\bar{x} \pm s$	5973	74.1 $\pm$ 4.3	6009	73.8 $\pm$ 5.2

Differenzen der Mittelwerte (Ejakulat 1 und 2) nicht signifikant
($P > 0.05$; t-Test)

4.2.3. Vergleich der Verfahren.

4.2.3.1. Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien nach Schätzung und nach Videomikrographie.

Bei den mit Hilfe der Videomikrographie untersuchten Ejakulaten wurde auch eine subjektive Beurteilung, d.h. eine visuelle Schätzung der Vorwärtsbewegung der Spermien durch das Fachpersonal der Besamungszentrale Neustadt a.d. Aisch vorgenommen.

Es zeigte sich, daß die Schätzwerte (Tab. 9) überwiegend niedriger lagen als die mit beiden videomikrographischen Methoden ermittelten Werte (Tab. 4, 5, 6). Der durchschnittliche Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien aus insgesamt 40 Ejakulaten betrug nach Schätzung $45.5 \pm 12.4 \%$ und war somit signifikant ($P \leq 0.01$) geringer als in den beiden objektiven Verfahren (56.9 ± 9.6 bzw. 56.1 ± 10.2 ; Tab. 10).

Für die geschätzten Prozentsätze vorwärtsbeweglicher Spermien auf der einen Seite und den mit der manuellen bzw. computergesteuerten Videomikrographie ermittelten Werte auf der anderen Seite, ließen sich signifikante lineare Regressionen errechnen (Abb. 3, Abb. 4). Aus der Verteilung der Punktwolke um die jeweilige Regressionsgerade und aus den relativ niedrigen Korrelationskoeffizienten ($r = 0.48$ bzw. $r = 0.44$; $P \leq 0.01$) läßt sich jedoch ersehen, daß im Einzelfall die Ergebnisse der Schätzung und der Videomikrographie erheblich voneinander abwichen.

Tab. 9: Ergebnis der subjektiven Schätzung für den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien in 40 Samenproben (jeweils 2 Ejakulate von 20 Bullen) nach Tiefgefrierkonservierung.

Bulle	Ejakulat 1	Ejakulat 2
	%	%
1	55	55
2	55	50
3	50	50
4	60	50
5	55	55
6	40	10
7	60	55
8	50	40
9	40	50
10	40	30
11	50	55
12	50	30
13	20	20
14	40	35
15	50	30
16	55	65
17	55	55
18	25	50
19	35	50
20	50	50

$\bar{x} \pm s$	$46,8 \pm 10.9$	$44,3 \pm 13.9$
-----------------	-----------------	-----------------

Differenzen der Mittelwerte (Ejakulat 1 und 2) nicht signifikant ($P > 0.05$; t-Test)

Tab. 10: Vergleich der mit Hand- und Computerauswertung ermittelten Prozentsätze vorwärtsbeweglicher Spermien. Durchschnittswerte von 20 bzw. 40 Samenproben (2 Ejakulate von 20 Bullen).

Untersuchungs- material	Schätzung $\bar{x} \pm s$	Videomikrographie	
		manuell $\bar{x} \pm s$	computergesteuert $\bar{x} \pm s$
Ejakulat 1	46.8 $\pm$ 10.9	58.2 $\pm$ 10.1	54.7 $\pm$ 8.7
Ejakulat 2	44.3 $\pm$ 13.9	55.6 $\pm$ 9.1	57.5 $\pm$ 11.6
	a	b	c
Ejakulat 1+2	45.5 $\pm$ 12.4	56.9 $\pm$ 9.6	56.1 $\pm$ 10.2

Differenzen zwischen den Ejakulaten in den einzelnen Verfahren nicht signifikant ($P > 0.05$; t-Test)

Differenz a-b signifikant ($P \leq 0.01$; t-Test)

Differenz a-c signifikant ($P \leq 0.01$; t-Test)

Differenz b-c nicht signifikant ($P > 0.05$; t-Test)

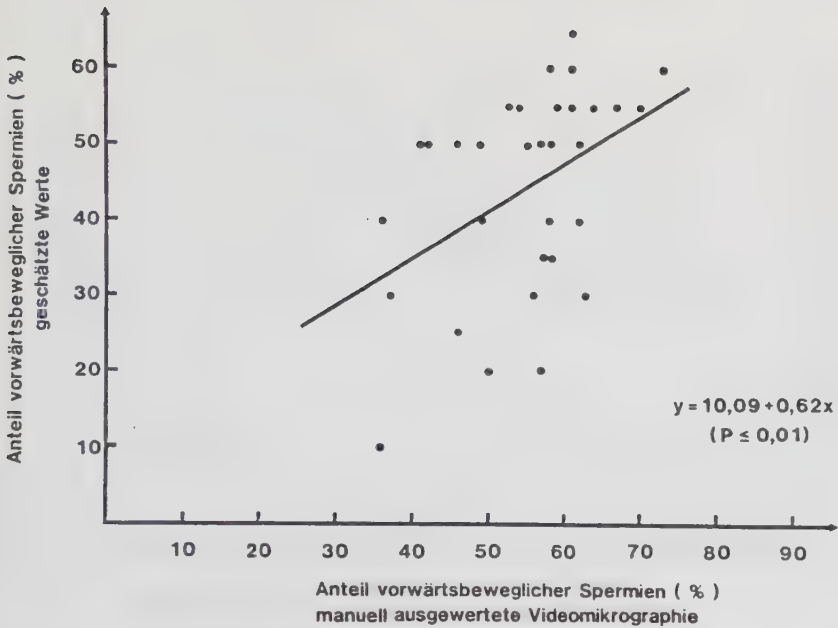


Abb. 3: Beziehung zwischen dem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien; manuelle Auswertung der Videomikrographie / geschätzte Werte (40 Wertepaare von 20 Bullen à 2 Ejakulate).

4.2.3.2. Vergleich der beiden videomikrographischen Verfahren.

Die Durchschnittswerte der videomikrographisch erfaßten Motilitätsparameter (% vorwärtsbeweglicher Spermien; Geschwindigkeit) für die 40 Ejakulate unterschieden sich kaum. Bei der manuellen Methode ergaben sich Werte von $56.9 \pm 9.6 \%$ ($\bar{x} \pm s$) vorwärtsbeweglicher Spermien, die computergesteuerte Auswertung führte zu einem Durchschnittswert von $56.1 \pm 10.2 \%$ ($\bar{x} \pm s$; Tab. 3).

Da die Bestimmung der Durchschnittsgeschwindigkeit bei der manuellen Auswertung dazu führt, Spermien, die sich geradlinig vorwärtsbewegen zu selektieren, wurden zum direkten Vergleich der beiden Verfahren nur die geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien der Computerauswertung herangezogen.

Bei der manuellen Auswertung betrug die durchschnittliche Geschwindigkeit $83.2 \pm 6.3 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ ($\bar{x} \pm s$), bei der Computerauswertung $81.5 \pm 6.1 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ (Tab. 3, $P > 0.05$; t-Test).

Betrachtet man das Gesamtmaterial (40 Ejakulate), so ist bei den Ergebnissen der zwei videomikrographischen Methoden eine relativ deutliche Beziehung festzustellen. Zwischen beiden Ver-

fahren bestand eine positive lineare Regression und zwar sowohl beim Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien (Abb. 5) als auch in der Geschwindigkeit der Spermien (Abb. 6). Im Einzelfall waren aber auch hier erhebliche Diskrepanzen in den Ergebnissen der beiden Verfahren gegeben (Tab. 4, 5, 6; Abb. 5, 6). Die Korrelationskoeffizienten betrugen $r = 0.52$ ($P \leq 0.01$) für die Prozentsätze vorwärtsbeweglicher Spermien bzw. $r = 0.54$ ($P \leq 0.01$) für die Spermengeschwindigkeit.

Aus der Gegenüberstellung der Geschwindigkeitsverteilungskurven ist ersichtlich, daß bei der manuellen Auswertung ein Maximum bei $70 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ (Abb. 7), bei der computergesteuerten Auswertung ein Gipfel bei $69.8 - 81.4 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ gegeben ist (Abb. 8). Zum direkten Vergleich der beiden Auswertungsverfahren wurden nur die Gruppen ab $55 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ herangezogen, da bei der manuellen Methode langsamer bewegliche Spermien nur schwer erfaßt werden können und deshalb angenommen wurde, daß sie nicht ihrem Anteil entsprechend vertreten sind.

4.2.4. Beziehungen zwischen dem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien sowie der Spermengeschwindigkeit der Einzelejakulate und ihren Non-Return Raten.

Anhand von 2886 Erstbesamungen konnten die Zusammenhänge zwischen den videomikrographisch ermittelten Parametern der Einzelejakulate und ihren jeweiligen Non-Return Raten überprüft werden.

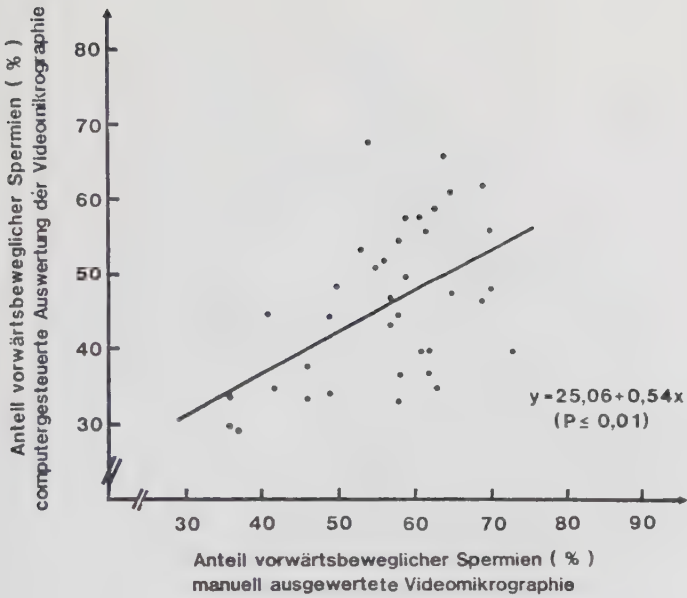


Abb. 5: Beziehung zwischen dem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien bei manueller und computergesteuerter Auswertung der Videomikrographie (40 Wertepaare von 20 Bullen à 2 Ejakulate).

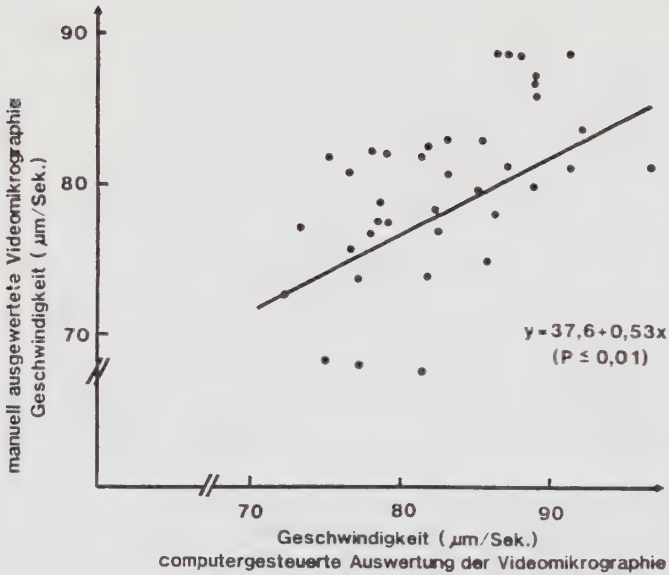
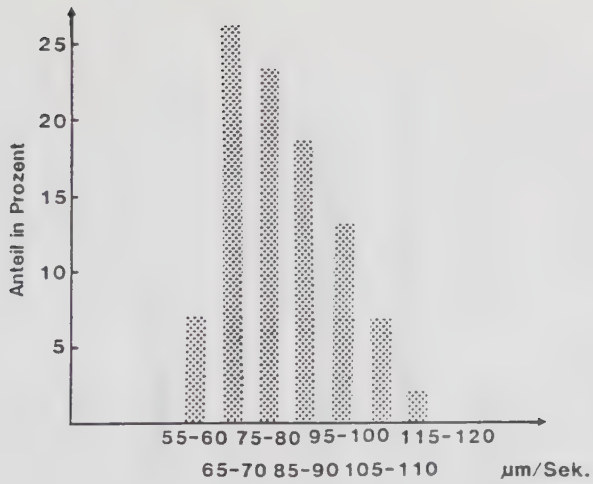
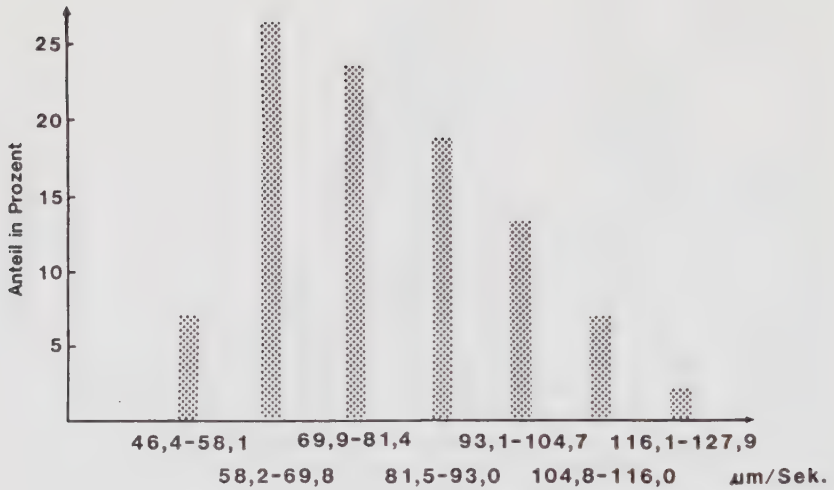


Abb. 6: Beziehung zwischen der Geschwindigkeit vorwärtsbeweglicher Spermien bei manueller und computergesteuerter Auswertung der Videomikrographie (40 Wertepaare von 20 Bullen à 2 Ejakulate).



Spermengeschwindigkeit (µm/Sek.)
manuelle Auswertung der Videomikrographie

Abb. 7: Manuelle Auswertung der Videomikrographie -
Geschwindigkeitsverteilung vorwärtsbeweglicher Spermien
(40 Samenproben von 20 Bullen à 2 Ejakulate)



Spermengeschwindigkeit (µm/Sek.)
computergesteuerte Auswertung der Videomikrographie

Abb. 8: Computergesteuerte Auswertung der Videomikrographie -
Geschwindigkeitsverteilung vorwärtsbeweglicher Spermien
(40 Samenproben von 20 Bullen à 2 Ejakulate)

Die deutlichste Beziehung zu den Non-Return Raten wies der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien bei der manuellen Auswertung auf ($r = 0.54$; $P \leq 0.01$; Tab. 11). Dagegen ergab sich für den Prozentsatz aller vorwärtsbeweglicher Spermien bei der Computerauswertung nur eine Korrelation zur Non-Return Rate von $r = 0.16$ ($P > 0.05$). Verwendet man für die Berechnung nur die als geradlinig vorwärtsbeweglich definierten Spermien, so liegt auch für die computergesteuerte Auswertung eine signifikante Beziehung zu den Non-Return Raten von $r = 0.32$ ($P \leq 0.01$) vor.

Die Prozentsätze der ortsbeweglichen bzw. der unbeweglichen Spermien, die nur bei der computergesteuerten Videomikrographie erfaßt wurden, waren negativ mit den entsprechenden Non-Return Raten korreliert ($r = -0.21$; $P > 0.05$ bzw. $r = -0.12$; $P > 0.05$, Tab. 11). Zwischen der Geschwindigkeit der geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien und den Non-Return Raten zeigte sich, wenn die Ergebnisse so pauschal in die Berechnungen eingingen, keine signifikante Korrelation (Tab. 11).

Für die Arbeit an Besamungsstationen ist die Erkennung von Ejakulaten mit schlechter Befruchtungschance von besonderer Bedeutung. Aus diesen Gründen wurden jeweils 5 Ejakulate mit den im Versuch ermittelten höchsten bzw. niedrigsten Non-Return Raten zusammengefaßt und überprüft, ob sich diese beiden "Extremgruppen" auch in ihren videomikrographisch ermittelten Werten für die Motili-

tät der Spermien unterscheiden. Als Parameter wurde der Anteil der Spermien mit einer Geschwindigkeit über 70 $\mu\text{m}/\text{Sekunde}$ gewählt (Tab. 12). Es zeigte sich, daß sowohl bei der manuellen als auch bei der computergesteuerten Auswertung die Gruppe der Ejakulate mit den niedrigen Non-Return Raten im Durchschnitt einen kleineren Prozentsatz sich mit mehr als 70 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ vorwärtsbewegenden Spermien aufwies als die Gruppe mit den höheren Non-Return Raten (Diff. 0.01; t-Test).

Tab. 11 Korrelationskoeffizienten der untersuchten Samenparameter zur Non-Return Rate am Beispiel von 40 Samenproben (jeweils 2 Ejakulate von 20 Bullen). Die Non-Return Raten wurden anhand von 2886 Erstbesamungen ermittelt.

Parameter	Videomikrographie	
	manuell	computergesteuert
Vorwärtsbewegliche Spermien (%)	0.54**	0.16
Geradlinig vorwärtsbewegliche Spermien (%)	nicht gesondert erfaßt	0.32*
Ortsbewegliche Spermien (%)	nicht erfaßt	-0.21
Unbewegliche Spermien (%)	nicht erfaßt	-0.12
Geschwindigkeit der geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien	0.13	-0.06

* $P > 0.05$; ** $P \leq 0.01$

Tab. 12: Vergleich der Spermengeschwindigkeit in jeweils 5 Ejakulaten mit hohen und niedrigen Non-Return Raten.

Bulle	Ejakulat-Nr.	NRR in %	Anteil(%) der Spermien über 70 μ m/Sek.	
			Videomikrographie manuell	Computergesteuerte Auswertung
4	1	79.7	86.6	40.3
16	1	75.3	64.0	46.5
15	1	72.0	62.6	52.0
1	1	71.4	85.6	50.7
5	1	70.0	61.6	40.2
		a	a ₁	a ₂
		73.7	72.0	46.0
12	2	65.8	29.6	27.7
6	1	63.5	31.6	31.8
6	2	53.5	34.6	25.1
20	1	53.3	63.6	24.7
17	1	50.0	50.3	35.7
		b	b ₁	b ₂
		57.2	41.8	29.0
Differenz a-b P $\leq$ 0.01 (t-Test)				
" a ₁ -b ₁ P $\leq$ 0.01 (t-Test)				
" a ₂ -b ₂ P $\leq$ 0.01 (t-Test)				

5. DISKUSSION

Im Rahmen der Tiefgefrierkonservierung von Sperma für die künstliche Besamung beim Rind erfolgt zunächst eine Untersuchung des Nativsamens sowie anschließend eine Überprüfung des Einfrierergebnisses. Dadurch sollen Bullen oder einzelne Ejakulate, die kein zufriedenstellendes Befruchtungsvermögen erwarten lassen, von der künstlichen Besamung ausgeschlossen werden.

Bei den auf diese Weise für die künstliche Besamung ausgewählten Samenproben ergeben sich jedoch häufig bedeutende Differenzen im Befruchtungsvermögen. Die hier eingesetzten 20 geprüften Altbullen des Besamungsvereins Neustadt a.d. Aisch e.V. hatten ein Jahr vor Versuchsbeginn eine Variationsbreite der individuellen Non-Return Raten von 53.5 % bis 73.0 % (Tab.2). Die im Versuchszeitraum selbst verwendeten 40 Ejakulate erbrachten Non-Return Raten von 50.0 % bis 79.7 % (Tab.2).

Diese Problematik der relativ ungenauen Vorhersage des Befruchtungsvermögens einer Samenprobe konnte mit den bisher üblichen Routineverfahren der Spermabeurteilung nicht gelöst werden. Die Beurteilung der Motilität nimmt dabei eine zentrale Stellung ein. Bislang wird an Besamungsstationen für die Spermienmotilität nur der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher und ortsbeweglicher Spermien sowie eventuell der Anteil pathologischer Bewegungsformen als

Selektionskriterium benützt. Diese Parameter können nur subjektiv erfaßt, also geschätzt werden. Diskrepanzen zwischen diesen Formen der Spermienmotilität und dem Befruchtungsvermögen glaubte man auf individuell bedingte Schätzfehler zurückführen zu müssen. Die Geschwindigkeit der Spermien blieb in diesem Zusammenhang völlig unbeachtet.

An vielen Stellen wird deshalb versucht, die bisher übliche subjektive Schätzung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und unbeweglicher Spermien durch eine objektive Bestimmung zu ersetzen und Verfahren zur Bestimmung der Spermien-
geschwindigkeit zu entwickeln. Photo -oder videomikrographische Aufnahmen der Spermien, die durch Handmessung oder mit Hilfe von Computerprogrammen ausgewertet wurden, erwiesen sich nach den Erfahrungen anderer Autoren (JECHT und RUSSO 1973; LIU und WARME 1975; AMANN und HAMMERSTEDT 1980) als grundsätzlich brauchbar. Damit ist es auch möglich geworden, die Geschwindigkeit der Spermien, und zwar sowohl einzelner Spermien als auch die Durchschnittsgeschwindigkeit einer Spermienpopulation, zu messen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Anwendbarkeit eines solchen Verfahrens zur objektiven Motilitätsbeurteilung an Tiefgefriersperma von Bullen zu überprüfen und gleichzeitig die ermittelten Samenparameter zum Befruchtungsergebnis dieser Spermaproben in Beziehung zu setzen.

Die beiden hier eingesetzten videomikrographischen Verfahren der Motilitätsbeurteilung von Bullenspermien unterschieden sich nur im Auswertungsmodus.

Für die manuelle Auswertung der Videobilder fand das von KATZ und OVERSTREET (1981) erstmals beschriebene Verfahren Verwendung. Die Brauchbarkeit dieser Methode bei Frischsamen und TG-Sperma von Bullen wurde bereits belegt (RIEMKE 1984). Die eigenen Ergebnisse bestätigen diese Erfahrungen weitgehend. Die Nachteile dieser Methode liegen einmal in der nicht vollständig zu vermeidenden subjektiven Selektion der zu messenden Spermien, zum anderen ist der zeitliche Aufwand für Reihenuntersuchungen zu hoch.

Gerade in diesen beiden Punkten weist das hier erstmals eingesetzte computergesteuerte Auswertungsverfahren entscheidende Vorteile auf. Die Selektion der zu messenden Spermien erfolgt automatisch nach objektiven Kriterien, wie Grauwert und Partikelgröße. Der Zeitaufwand wird auf wenige Minuten reduziert. Darüberhinaus können verschiedene Bewegungsformen differenziert werden. Für diese Untersuchungen wurden die Spermien auf Grund ihrer Geschwindigkeit in unbeweglich ($\leq 11.6 \mu\text{m}/\text{Sek.}$), ortsbeweglich ($> 11.6 - \leq 35 \mu\text{m}/\text{Sek.}$) und vorwärtsbeweglich ($> 35 \mu\text{m}/\text{Sek.}$) eingeteilt. Samenzellen mit einer Geschwindigkeit unter $12.6 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ wurden deshalb als unbeweglich eingestuft, weil bei diesen Formen

erfahrungsgemäß vielfach Lageveränderungen durch Erschütterungen o.ä. vorkommen, die vom Computer erfaßt wurden, aber nicht als eigenständige Bewegungen anzusehen sind. Als Obergrenze für "ortsbewegliche" Spermien wurde eine Geschwindigkeit von ≤ 35 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ gewählt, weil gewisse Ortsveränderungen in einer Suspension mit aktiv beweglichen Zellen erfolgen, ohne daß es sich um eine zielgerichtete Bewegung handelt, insbesondere, weil bei den bisherigen Messungen von Hand die gleiche Differenzierung verwendet wurde. Dadurch ergab sich eine bessere Ausgangsbasis für einen Vergleich der Messergebnisse aus beiden Verfahren.

Die vorwärtsbeweglichen Spermien selbst konnten beim Computersystem weiter in geradlinig und nicht geradlinig vorwärtsbewegliche Samenzellen unterteilt werden. Diese Differenzierung erfolgte auf Grund eines Vergleiches zwischen der tatsächlich zurückgelegten Wegstrecke, also der Bahn, die der Spermienkopf beschrieb, und der geraden Linie zwischen der Position des Kopfes zu Beginn und am Ende der Messung. Wenn die tatsächliche Wegstrecke mindestens 20 % länger war als die Gerade zwischen Anfang und Endpunkt, wurde von einer nichtgeradlinigen Vorwärtsbewegung gesprochen (Abb. 1). Diese Art der Eingruppierung durch das Computersystem bedarf noch einer weiteren Überprüfung.

Manuelle und computergesteuerte Auswertung führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Die erwähnte Übereinstimmung trifft für die in

allen 40 Ejakulaten ermittelten Durchschnittswerte des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien und deren Durchschnittsgeschwindigkeiten zu. Der letztere Parameter war bei beiden Methoden beinahe gleich, wenn bei der Computerauswertung die Geschwindigkeit der geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien herangezogen wurde (Tab. 3). Dagegen war die Durchschnittsgeschwindigkeit aller vorwärtsbeweglichen Spermien bei der Computeranalyse signifikant langsamer ($P \leq 0.01$).

Es liegt nahe daran zu denken, daß bei der manuellen Auswertung eine subjektive Auswahl zugunsten der Messung von geradlinig schwimmenden Spermien nicht vermieden werden konnte. Andererseits ist der Geschwindigkeitsunterschied zwischen geradlinig und nicht geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien bei der Computerauswertung nur $7.5 \mu\text{m}/\text{Sek}$ (81.5 gegenüber $74.0 \mu\text{m}/\text{Sek}$). Dies ist vor allem auch deshalb bemerkenswert, weil die Anteile geradlinig schwimmender bzw. aller vorwärtsbeweglicher Spermien im Durchschnitt der 40 Ejakulate stark differierten (31.4% , Ejakulat 1 und 32.1% , Ejakulat 2; Tab 5, 6, mit einem durchschnittlichen Gesamtwert von 31.8% gegenüber 56.1% ; Tab. 3). Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Differenzierung auf Grund der Wegstreckenlänge überdacht werden muß. Ob die Erfassung dieser Subpopulation einer Spermaprobe von Bedeutung ist, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Die in den Einzelejakulaten gefundenen Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien schwankten bei diesen vorselektierten Spermaproben zwischen 36 und 73% (manuelle Auswertung) bzw. 38.6 und 77.3% (computergesteuerte Auswertung).

Derartige Unterschiede können auch durch die bisher übliche Schätzung verifiziert werden. Abgesehen von diesen Extremwerten erscheint es aber unmöglich, die hier gefundenen Schwankungen durch eine subjektive Beurteilung zu belegen.

Die Gegenüberstellung der Schätzwerte und der mit den beiden videomikrographischen Methoden ermittelten Werte unterstreichen die oben erwähnten Überlegungen (Tab. 10). Der geschätzte Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien war mit durchschnittlich $45.5 \pm 12.5 \%$ erheblich niedriger als die mit der Videomikrographie gemessenen Werte (56.9 ± 9.6 bzw. $56.1 \pm 10.2 \%$). Die Ergebnisse der Schätzung und der Videomikrographie wichen im Einzelfall erheblich voneinander ab (Abb. 3, 4). Die ermittelten Diskrepanzen weisen auf die Notwendigkeit hin, die subjektive Beurteilung des Anteils motiler Spermien durch objektive Methoden zu ergänzen.

In Anbetracht der oben aufgeführten Vorteile, erfüllt die Methode der computergesteuerten Auswertung der Videomikrographie die wesentlichen Anforderungen, die an ein objektives Verfahren zu stellen sind (RIEMKE 1984).

Die Möglichkeit, spezifische Parameter der Spermienmotilität in vitro zu messen, gestattet ihre biologische Bedeutung zu überprüfen. Deshalb wurde untersucht, welche Beziehungen zwischen den nun erfaßbaren Kriterien der Spermienmotilität und dem Befruchtungsvermögen bestehen.

Seit dem Einsatz der elektronischen Datenverarbeitung ist es möglich, auch für Tiefgefriersperma mit einem tragbaren Aufwand Non-Return Raten von Einzelejakulaten zu erhalten. Im Besamungsverein Neustadt a.d. Aisch e.V. liegen solche Daten seit Jahren vor. Es wurden 20 Bullen ausgewählt, die eine möglichst breite Variation der individuellen Non-Return Rate erkennen ließen (53.5 % bis 73.0 %). Die von diesen 20 Bullen verwendeten Ejakulate erbrachten auch im Versuchseinsatz eine ähnliche Variation der Non-Return Raten (50.0 % bis 79.7 %). Nur bei einer entsprechenden Varianz der Befruchtungsergebnisse ist zu erwarten, daß eine Korrelation mit einem Kriterium der Spermaqualität statistisch nachweisbar ist. Die signifikante Korrelation ($r = +0.51$; $P \leq 0.01$) zwischen der Non-Return Rate dieser Auswahl und derjenigen des Versuchs weist darauf hin, daß die individuelle Non-Return Rate eines Bullen nicht zufällig schwankt, sondern in Grenzen individuell fixiert ist.

Beim Vergleich der im Versuch erzielten Non-Return Raten mit den in der Tiefgefrier-Spermaprobe ermittelten Motilitätsparametern ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen dem mit der Handmessung ermittelten Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien ($r = 0.54$; $P \leq 0.01$) und der Non-Return Rate. Dagegen konnte bei der Computerauswertung kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Anteil aller vorwärtsbeweglichen Spermien und der Non-Return Rate gefunden werden ($r = 0.16$; $P > 0.05$). Dies rührt wahrscheinlich daher, daß bei der computergesteuerten Auswertung in diesem Zu-

sammenhang alle vorwärtsbeweglichen Spermien berücksichtigt wurden, während bei der manuellen Methode vorwiegend geradlinig schwimmende Spermien erfaßt wurden. Es ist anzunehmen, daß letztere hinsichtlich des Befruchtungsvermögens höher einzustufen sind als die Gesamtheit aller vorwärtsbeweglichen Spermien. Für diese Annahme spricht auch die Beobachtung, daß für die als geradlinig definierten Spermien bei der Computerauswertung ebenfalls eine signifikante Korrelation zu den Non-Return Raten gefunden wurden ($r = 0.32$; $P \leq 0.01$; Tab. 11).

Die durchschnittliche Geschwindigkeit aller Spermien war nicht mit den Non-Return Raten korreliert, weder bei der manuellen ($r = 0.13$; $P > 0.05$) noch bei der computergesteuerten Auswertung ($r = -0.06$; $P > 0.05$). Dies muß aber nicht bedeuten, daß die Geschwindigkeit der Spermien für das Befruchtungsvermögen eines Ejakulates keine Rolle spielt.

Der Vergleich der in diesen Untersuchungen erfaßten Samenparameter der Ejakulate mit den höchsten bzw. niedrigsten Non-Return Raten (Tab. 12) läßt vermuten, daß möglicherweise der Anteil von Spermien mit einer bestimmten Mindestgeschwindigkeit und die Höhe der Non-Return Rate korreliert sind. Bei einer Gegenüberstellung von je 5 Ejakulaten mit den höchsten bzw. niedrigsten Non-Return Raten zeigte sich, daß die Prozentsätze der Spermien mit einer Geschwindigkeit über $70 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ in den "besseren" Ejakulaten durchschnittlich höher waren als in den schlechteren (Tab. 12). Diese Beobachtung wurde sowohl bei der manuellen als auch bei der computergesteuerten Auswertung gemacht.

Bei der Bewertung der Zusammenhänge zwischen den hier überprüften Sameneigenschaften und der Fruchtbarkeit ist zu berücksichtigen, daß im Rahmen der künstlichen Besamung generell nur Bullen mit guter Spermaqualität und Fertilität eingesetzt werden. Die aus wirtschaftlicher Sicht gesehen großen, biologisch betrachtet aber relativ geringen Unterschiede zwischen den Non-Return Raten der einzelnen Vatertiere und ihrer Beziehungen zu den Spermaparametern sind deshalb statistisch nur schwer zu belegen. Wird das Material entsprechend selektiert, d.h., daß auch Bullen mit einer deutlich schlechteren Spermaqualität miteinbezogen werden, können nach Erfahrungen anderer Autoren (SALISBURY und VANDEMARK 1961; LINFORD und GLOVER 1976) Zusammenhänge zwischen bestimmten Spermaparametern und dem Befruchtungsvermögen sehr gut nachgewiesen werden.

Weiterhin darf nicht vergessen werden, daß eigentlich nur die Gesamtheit aller Samenparameter und ihr Verhältnis zueinander Aussagen über das mutmaßliche Befruchtungsergebnis zulassen. Insbesondere die Struktur der Kopfkappe (Akrosom) scheint hier eine besondere Rolle zu spielen (SAACKE und WHITE 1972). Letztendlich ist das tatsächliche Befruchtungsvermögen einer Samenprobe das Resultat der Beschaffenheit vieler Faktoren der Samenzellen, die mit den üblichen Spermauntersuchungen nicht erfaßt werden.

Für die Arbeit an den Besamungsstationen, d.h. für die möglichst präzise Vorhersage des Befruchtungsvermögens eines Ejakulates, ist die Berücksichtigung dieser Vielzahl von Spermaparametern jedoch nicht praktikabel. Dagegen scheint die Kombination einiger weniger Parameter, wie Spermienkonzentration, Mißbildungsrate und Motilität aussagefähig und ihre Untersuchung mit zumutbarem Aufwand durchführbar zu sein. Die Möglichkeit, die Motilität mit Hilfe der Videomikrographie jetzt objektiv und weitgehend automatisiert zu erfassen, wird diese Tendenz bestärken.

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß mit Hilfe dieser Form der Videomikrographie auch an einem für die Zwecke der künstlichen Besamung vorselektierten Material generell Zusammenhänge zwischen dem Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien, der Spermengeschwindigkeit und dem Befruchtungsvermögen dieser Samenproben zu belegen sind. Ziel zukünftiger Untersuchungen muß es sein, die mit der Videomikrographie erfaßbaren Parameter so zu modifizieren und zu definieren, daß die Vorhersage des Befruchtungsvermögens einer Samenprobe mit größerer Sicherheit als zur Zeit möglich wird. Darüberhinaus muß das Verfahren der Auswertung beschleunigt und daraufhin überprüft werden, ob es im Routinebetrieb einsetzbar ist und zur Verbesserung der Beurteilung der Qualität von Spermaproben beiträgt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde eine computergesteuerte Auswertung der Videomikrographie von Spermaproben auf ihre Brauchbarkeit untersucht, um Beziehungen zwischen der Vorwärtsbewegung und Geschwindigkeit von Bullenspermien einerseits und dem Befruchtungsvermögen der entsprechenden Samenprobe andererseits überprüfen zu können.
2. Von 40 Ejakulaten (je 2 von 20 Bullen), die in der Besamungszentrale Neustadt/Aisch e.V. gewonnen und als Tiefgefrier-Sperma konfektioniert worden waren, wurden zur Ermittlung der Non-Return Rate jeweils 80 Pailletten in der künstlichen Besamung eingesetzt. Von diesen Spermaproben wurden verschiedene Motilitätsparameter durch Videomikrographie mit manueller sowie einem computergesteuerten Auswertungsmodus bestimmt.
3. Bei der manuellen Auswertung betrug der durchschnittliche Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien 56.9 % und die Durchschnittsgeschwindigkeit 83.2 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$, bei der computergesteuerten Auswertung 56.1 % bzw. 81.5 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ Zwischen dem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien und der Geschwindigkeit ergab sich eine signifikante lineare Regression für die manuelle Auswertung der Videomikrographie ($P \leq 0.01$).

4. Die Schätzung der Vorwärtsbewegung der Spermien in der üblichen Weise erbrachte einen durchschnittlichen Wert von 45.5 % und lag signifikant ($P \leq 0.01$; t-Test) unter den Ergebnissen der beiden videomikrographischen Meßverfahren mit 56.9 % (manuell) und 56.1 % (computergesteuert).
5. Durch die computergesteuerte Auswertung aller Samenproben konnten verschiedene Bewegungsklassen der Spermien differenziert werden (Durchschnittswerte in Klammer): unbeweglich ($< 35 \mu\text{m}/\text{Sek.}$; 28.3 %), ortsbeweglich ($\leq 35 \mu\text{m}/\text{Sek.}$; 15.3 %) und vorwärtsbeweglich ($> 35 \mu\text{m}/\text{Sek.}$; 56.1 %). Der Anteil der vorwärtsbeweglichen Spermien konnte in geradlinig (31.4 %, Ejakulat 1 und 32.1 %, Ejakulat 2; durchschnittlicher Gesamtwert 31.8 %) und nicht geradlinig (24.3 %) unterteilt werden. Die durchschnittliche Geschwindigkeit für die sich geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien betrug $81.5 \mu\text{m}/\text{Sek.}$, für die sich nicht geradlinig beweglichen Spermien $74.0 \mu\text{m}/\text{Sek.}$
6. Eine signifikante Korrelation zur Non-Return Rate der Ejakulate ergab sich für den Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermien bei der manuellen Auswertung der Videomikrographie ($r = 0.54$; $P \leq 0.01$), ebenso für die als geradlinig vorwärtsbeweglich definierten Spermien der computergesteuerten Auswertung ($r = 0.32$; $P \leq 0.01$).

7. Die Videomikrographie mit computergesteuerter Auswertung erlaubt eine rasches und sicheres Erfassen verschiedener Motilitätsparameter von Bullenspermien.

7. SUMMARY

Investigations of the motility of bull spermatozoa, in particular the influence of velocity on fertility.

1. Bull semen was evaluated for usability with computerized videomicrography to determine whether a relationship exists between progressive motility and velocity on the one hand and fertility on the other hand.
2. A total of 40 ejaculates (2 ejaculates each from 20 bulls) were collected and frozen in straws. The bulls belonged to the Artificial Insemination Station Neustadt/Aisch. Eighty straws were used for artificial insemination to determine the non-return rate. Manual and computerized methods of videomicrography were used to measure various motility parameters of the semen probes.
3. The average progressive motility was 56.9 % and the average velocity was 83.2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ using the manual technique. The computer analysis resulted in 56.1 % average progressive motility and 81.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ average velocity. A significant linear relation was found between the percent of motile spermatozoa and velocity for manual technique.

4. The estimated progressive semen motility averaged 45.5 %. This was significantly lower than the measured results of both videomicrographic methods ($p \leq 0.01$) with 56.9 % (manual) and 56.1 (computerized).
5. Motility could be differentiated into various types with the computer analysis: non-motile ($< 35 \mu\text{m/sec}$; 15.3 %), non-progressive motile ($\leq 35 \mu\text{m/sec}$; 28.3 %) and progressive motile ($> 35 \mu\text{m/sec}$; 56.1 %). Progressively motile spermatozoa could be further differentiated into straight progressive or not straight progressive. In addition the velocity of both types of movement can be determined.
6. A significant correlation was found between the non-return rate of the ejaculates and the percent progressive motile spermatozoa (manual technique: $r = 0.54$, $p \leq 0.01$) as well as for spermatozoa defined straight progressive (computer technique: $r = 0.32$, $p \leq 0.01$).
7. Videomicrography, in particular computer analysis method, allows fast and reliable evaluation of various motility parameters of bull spermatozoa.

8. LITERATURVERZEICHNIS

AMANN, R.P. (1979):

Computerized measurements of sperm velocity and percentage of motile sperm.

In: The spermatozoon, edited by FAWCETT, D.W. and J.M. BEDFORD, 431-435, Urban und Schwarzenberg, Baltimore

AMANN, R.P. and H.R. HAMMERSTEDT (1980):

Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm.

Biol.Reprod. 23, 647-656.

BISHOP, R.C. (1953):

Semen characteristics and fertility in the bull.

J.Agric.Sci. Camb. 44, 227-248

BUSCH, W. (1982):

Insemination.

In: Künstliche Besamung bei Nutztieren,

Herausgeber: BUSCH, W., K. KÖHLE und W. PETER, 307-346,

Ferdinand Enke Verlag Stuttgart

GOETZE, R. (1949):

Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere.

Verlag M. und H. Schaper, Hannover.

JECHT, B.W. and J.J. RUSSO (1973):

A system for the quantitative analysis of human sperm motility.

Andrologia 5, 215-221.

KATZ, D.F. and J.W. OVERSTREET (1980):

A new quantitative test for sperm penetration into cervical mucus.

Fert.Steril. 33, 179-186.

KATZ, D.F. and J.W. OVERSTREET (1981):

Sperm motility assessment by videomicrography.

Fert.Steril. 35, 188-193.

KATZ, D.F., T.D. BLOOM and R.H. BON DURANT (1981):

Movement of bull spermatozoa in cervical mucus.

Biol. Reprod., 25, 931-937

LINFORD, E. and F.A. GLOVER (1976):

The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull.

J.Reprod.Fert., 47, 283-291

- LIU, Y.T. and P.K. WARME (1975):
Computerized evaluation of sperm cell motility.
Comp.Biomed.Res. 10, 127-138.
- MAKLER, A. (1978):
A new chamber for rapid sperm count and motility estimation.
Fert.Steril. 30, 313-318.
- MAKLER, A. (1979):
Simultaneous differentiation between motile, non motile and dead human spermatozoa by combining supravital staining and multiple exposure photography procedures.
Int. J. Androl. 2, page 32
- MAKLER, A. (1980a):
Use of the elaborated multiple exposure photography method in routine sperm motility analysis and for research purposes.
Fert.Steril. 33, 160-166.
- MAKLER, A. (1980b):
The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation.
Fert.Steril. 33, 337-338.
- MAKLER, A., J. ITS KOVITZ, J.M. BRANDES and E. PALDI (1979):
Sperm velocity and percentage of motility in 100 normospermic specimens analysed by the multiple expose photography (MEP) method.
Fert.Steril. 31, 155-161.
- MAKLER, A., M. TATCHER and J. MOHILEVER (1980):
Sperm semi-autoanalysis by a combination of multiple exposure photography (MEP) and computer techniques.
Int.J.Fert. 25, 62-66.
- O'CONNOR, M.T. R.P. AMANN and R.G. SAACKE (1981):
Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with standard laboratory tests and their use for predicting fertility.
J.Anim.Sci. 53, 1368-1376.
- ORTAVANT, R. (1959):
Spermatogenesis and morphology of the spermatozoon.
In: Reproduction in domestic animals, edited by COLE, H.H. and P.T. CUPPS, 1-46, Academic Press, New York and London.

- PAPA, F.O., J.PFEILSTICKER, H.MARRE, D.KRAUSE, und K.F.WEITZE (1982):
Problematik der Beziehung zwischen spermatologischen Parametern und Besamungsergebnissen nach Anwendung von tiefgefrorenem Bullensperma.
Zuchthyg. 17, 117-118.
- RIEMKE, P. (1984):
Untersuchungen zur Motilitäts- und Geschwindigkeitsmessung von Bullenspermien mit Hilfe der Videomikrographie.
Vet.med.Diss., München.
- SAACKE, R.G. and J.M. WHITE (1972):
Semen quality tests and their relationship to fertility.
Proc. 2nd NAAB Tech.Conf.Artif.Insem. and Reprod.,
22-27, Chicago
- SALISBURY, G.W. and N.L. VANDEMARK (1961):
Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle.
W.H. Freeman and Company, San Francisco and London.
- VAN DUIJN, C.jr. (1971):
Beziehungen zwischen den Eigenschaften des Samens und der Befruchtungsfähigkeit.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 78, 73-148.
- WALL, K.A. and M.A. BOONE (1973):
Objective measurement of sperm motility.
Poultry Sci. 52, 657-660.
- WEBER, Erna (1972):
Grundriß der biologischen Statistik.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Leidl für die Überlassung des Themas und die darüberhinaus stets gewährte Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich bei den Direktoren des Besamungsvereins Neustadt a.d. Aisch e.V. Herrn Dr. R. Hahn und Herrn W. Breuer, sowie bei Herrn Dr. Lorrmann für die Unterstützung in fachlichen und organisatorischen Fragen, und den am Versuch beteiligten Besamungsbeauftragten für die sorgfältige Mitarbeit.

Herrn Prof. Dr.Dr. Osterkorn danke ich für die immer gewährte Mithilfe bei den statistischen Berechnungen.

Ebenso möchte ich Herrn Dr.Dr. Stolla, Herrn Dr. Braun, Herrn Dr. Riemke, sowie den technischen Mitarbeiterinnen Frau Haitchi, Frau Schüssler, Frau Kraus und Frau Schorer für die Unterstützung und Mithilfe danken.

LEBENS LAUF

Am 08. Juli 1953 wurde ich als Sohn des Heizungsbaumeisters Erich-Walter Gschwend und der Apothekenhelferin Rosemarie Gschwend, geb. Scheible in Herrlingen geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die dortige Volksschule, wechselte 1964 an das Kepler-Gymnasium nach Ulm, und legte dort im Juni 1973 die Reifeprüfung ab.

Vom 01.10.73 bis 30.09.75 leistete ich Wehrdienst bei der Bundeswehr. Vom 01.11.75 bis 15.10.78 war ich als Krankenpfleger an der Urologischen Klinik der Universität Ulm tätig. Am 02.11.78 nahm ich an der Ludwig-Maximilians Universität München das Studium der Veterinärmedizin auf, das ich am 03.11.83 mit dem Staatsexamen abschloß.

Am 01.01.84 begann ich an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik, Lehrstuhl Prof. Dr. W. Leidl, mit der Anfertigung meiner Dissertation. Dort war ich vom 01.04.84 bis 31.12.84 als wiss. Hilfskraft halbtags beschäftigt, und bin seit 01.01.85 als vollbeschäftigte wiss. Hilfskraft tätig.

